动 物 学 研 究 2002, Jun. 23 (3): 242~247
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

综述

2n/4n 嵌合体胚胎的发育特点及其应用

文端成，陈大元[1]
(中国科学院动物研究所 生殖生物学国家重点实验室，北京 100080)

摘要：2n/4n 嵌合体是指用二倍体的胚胎细胞和四倍体的胚胎细胞聚合所形成的嵌合体。这种嵌合体在胚胎的发育过程中，四倍体来源的细胞在分布上具有一定的倾向性，即倾向于分布在胚外组织，如胎盘；而在胎儿本身的组织中，很少能找到四倍体细胞的存在。就 2n/4n 嵌合体胚胎的制作、嵌合体胚胎的发育特点及该技术的可能应用进行了综述。

关键词：二倍体；四倍体；嵌合体；发育特点；应用
中图分类号：Q813；Q819 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2002)03-0242-06

Developmental Characteristics and Applications of 2n/4n Chimaeras

WEN Duan-cheng, CHENG Da-yuan
(*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

Abstract: Aggregating diploid embryonic cells with tetraploid embryonic cells forms 2n/4n chimaeras. Tetraploid cells demonstrate a preferential distribution in chimaeras during embryonic development. Tetraploid cells are preferentially allocated to the extraembryonic tissues, such as placenta, rather than the fetus itself. This paper summarized methods of producing 2n/4n chimaeras, and developmental characteristics and possible applications of the chimaeras.

Key words: Diploid; Tetraploid; Chimaera; Developmental characteristic; Application

2n/4n 嵌合体胚胎是指用四倍体（4n）胚胎与二倍体胚胎（2n）或胚胎干细胞（ES 细胞）进行聚合，形成由二倍体和四倍体细胞组成的嵌合体。2n/4n 嵌合体胚胎在发育过程中，2 种类型的细胞（二倍体和四倍体）表现出非随机的分布特点。4n 来源的细胞通常分布在胚外组织（extraembryonic tissue)，如滋养层、卵黄囊膜、尿囊膜和胎盘等；4n 来源的细胞几乎不参与胎儿本身的形成。因为有这种特性，2n/4n 嵌合体胚胎在研究胚胎发育调控机理、建立基因缺陷动物模型和动物克隆上有着特殊的应用价值。本文就 2n/4n 嵌合体胚胎的制作、发育特点及其应用进行综述。

1 胚胎的制作

哺乳动物的四倍体在自然界中是一种染色体畸型，其自然发生率非常低。在小鼠中，四倍体胚胎可以着床，部分可发育到体节期（O'Nell *et al*., 1990; Kaufman & Webb, 1990)，有些甚至可以发育直到出生，但胎儿一般为畸型（Snow, 1973, 1975, 1976; Kaufman & Webb, 1990)。自然发生的 4n 胚胎的机率非常低。在实验室中，制作 4n 胚胎通常采用 3 种方法：一是用抑制胞质分裂的药物处理胚胎，使胞质停止分裂，但 DNA 可照常复制，从而使 DNA 的量在 1 个细胞中加倍，这样就得到

收稿日期：2001-12-17；接受日期：2002-03-15
基金项目：国家基础性研究重大关键项目计划（攀登-专-08)；中国科学院创新工程重大项目（KSCX1-05-01)
1. 通讯联系人

4n的胚胎（Snow，1973）。1973年，Snow报道了使用细胞松弛B（CB）成功制作4n小鼠胚胎的工作。他把2~4细胞期的小鼠胚胎放入含有10 μg/mL CB培养液中，培养2~4 h，再移入到普通培养液中培养，约有60%的胚胎成为四倍体。这种四倍体有40%~75%在体外可达到囊胚，但四倍体囊胚所含有的细胞数量比对照组要少。Snow把115枚四倍体的囊胚移植到24只假孕母鼠中，有14只妊娠，共有78个着床点，着床的胚胎大部分发育受阻，并停滞在器官发生阶段。二是显微注射方法。把一个2n的胚胎细胞核直接注入到受精卵中，这样发育而来的胚胎就是4n胚胎。Modlinski（1978）利用桑椹期的小鼠卵裂球作为核供体，注入到小鼠受精卵中，在注射的166枚受精卵中，有15枚成活，移植到输卵管中发育，有9枚发育到桑椹和囊胚。三是卵裂球融合方法。化学药物、仙台病毒和电击都能使卵裂球融合。Eglitis（1980）采用聚二乙醇（PEG）使小鼠的卵裂球融合，制成4n胚胎。4细胞期的胚胎用PHA处理后，成对聚合在一起，再用45%的PEG处理，结果有56.8%的卵裂球融合，并形成四倍体胚胎。Kaufman & Webb（1990）将小鼠2细胞期的胚胎以0.3 mol/L的甘露醇溶液为介质，放入到相距600 μm的2根金属丝中间，用200 V的电流电击50 μsec，在15~30 min后看到很高比例的2细胞胚胎的卵裂球发生了融合，形成1细胞。将这种4n的细胞胚胎直接移植到假孕小鼠的双侧输卵管中，有68.6%~95.7%的胚胎着床，并获得了妊娠15 d的4n胎儿。但4n的胎儿均为畸形，而且15 d的4n小鼠胎儿在形态上的发育也只相当于正常2n小鼠胎儿的13.5~14 d。

2 2n/4n嵌合体胚胎的构建

2n/4n嵌合体的制作通常采用胚胎聚合法，不同来源的2n细胞，从早期胚胎细胞到内细胞团（ICM）和ES细胞，均可与4n胚胎聚合形成嵌合体胚胎。

2.1 早期胚胎细胞与4n胚胎的聚合

2n小鼠胚胎的致密化发生在8细胞后期，而4n的小鼠胚胎则是发生在4细胞后期。在小鼠中，通常用未致密的早期胚胎进行聚合。胚胎用酸性Tyrode's溶液（pH 2.1）处理去除透明带，把1枚4n的4细胞胚胎和1枚2n的8细胞胚胎放在一块，用玻璃球进行挤压（Nagy *et al.*，1990），转入含有1% PHA的聚合液中培养24 h（Lu & Markert，1980）；或用2枚4n胚胎把1枚2n胚胎象"三明治"一样夹住，这种方法称"三明治法"（Lu & Markert，1980；Nagy *et al.*，1990）。聚合时，胚胎放入微培养孔（micro-well）中培养，当胚胎聚合后，体外培养到桑椹或囊胚，移植到假孕母体内妊娠。

2.2 细胞团（ICM、ES和ES样的细胞团）与4n胚胎的聚合

细胞团与4n胚胎的嵌合通常采用"三明治法"，即2枚去透明带的4n胚胎把细胞团夹在中间，顶端用球状的玻璃针挤压胚胎，使胚胎和细胞团紧贴在一块，在含有1% PHA的聚合液中培养24 h即可。在聚合时，细胞内的细胞个数与嵌合率及胚胎的发育率有一定的关系，当使用8细胞期的4n胚胎与ES细胞团嵌合时，ES细胞的数量为15~20个时，可得到较高的胚胎嵌合率和发育率（Nagy *et al.*，1990）。

2.3 囊胚腔内注入法

当4n胚胎发育到囊胚时，可以把2n胚胎细胞或ES细胞或内细胞团直接注入到囊胚腔内，形成1枚2n/4n嵌合体胚胎。胚胎注射后，在体外培养2~3 h，就可进行胚胎移植（Bradley *et al.*，1984）。Schreiber *et al.*（2000）把Fral$^{-/-}$小鼠胚胎干细胞直接注入到正常的四倍体囊胚腔中，移植后共获得15只小鼠仔，经检查，这15只小鼠的基因型均为Fral$^{-/-}$，这些新生小鼠都能存活2 d以上。

3 2n/4n嵌合体胚胎的发育特点

3.1 4n胚胎

着床前的4n胚胎与2n胚胎的卵裂速度没有明显的差异，2种类型的胚胎发育到囊胚期的速度也十分一致；但4n胚胎发育到囊胚时，囊胚中的细胞数比2n胚胎要少（Henery *et al.*，1992）。当移植到子宫后，4n胚胎也可以在子宫内着床，大部份能正常发育到妊娠中期；如果胎儿在子宫中继续发育，则有可能出现畸形。畸形出现的主要部位是在颅面部、脊椎轴和心脏（Kaufman & Webb，1990）。

3.2 2n/4n嵌合体胚胎

2n/4n嵌合体胚胎在发育上，其显著特点是4n

细胞在胚胎分布上的非随机性。当用早期4n胚胎与2n胚胎聚合形成2n/4n嵌合体后移植，在大部分的这种嵌合体中，4n来源的细胞被选择性地排斥掉（Nagy *et al.*，1990，1993），而在胚外膜组织（extraembryonic membranes）中，却大部分是由这种4n细胞组成（Tarkowski *et al.*，1977）。

Everett *et al.*（2000）研究了2n/4n嵌合体小鼠囊胚，在3.5 d时，4n细胞可以分布在所有3种细胞系中，但在壁滋养外胚层（mTE）中，4n细胞所占的比例明显高于极滋养外胚层（pTE）和内细胞团（ICM）。4n细胞在发育4.5 d前的胚胎还未出现明显的分布倾向性，而且，在所有的细胞系中，其所占比例均下降。从3.5 d到4.5 d的晚期囊胚中，4n细胞在3种细胞系中的比例都显著降低。在整个囊胚中，4n细胞的比例从3.5 d的25.1%下降到4.5 d的10.0%；在内细胞团中，由21.0%下降到13.3%；在滋养外胚层中，由26.8%下降到8.2%（Everett & West，1998）。4n细胞在滋养外胚层中的比例降低，可能是统计上的一种假象，因为4.5 d的胚胎滋养外胚层的细胞数量远多于3.5 d的胚胎的细胞数量（Everett & West，1998）。

胚胎发育到7.5 d后，4n细胞的倾向性分布开始出现。James *et al.*（1995）分析了7.5 d和12.5 d的2n/4n嵌合体胚胎，胚胎在7.5 d时的胎儿重量比对照组2n/2n嵌合体要轻，但到12.5 d时，2n/4n嵌合体胎儿的重量与对照组比较已无差异，但胎盘的重量却显著高于对照组。检查7.5 d和12.5 d两个时期的胚胎发现，4n细胞在这2个胚胎时期中都主要分布在原始内胚层［如体壁内胚层（parietal endoderm）、脏壁内胚层（visceral endoderm）］和滋养外胚层（如胎盘和滋养层）细胞中，而在原始外胚层（primitive ectoderm）细胞中，几乎找不到4n细胞的存在。在9.5 d后，2n/4n嵌合体的胎盘中，有超过50%的细胞是4n细胞（Tarkowski*et al.*，1977）。

在2n/4n嵌合体的发育过程中，4n细胞在胎儿组织中逐渐被排斥掉。Graham（1971）用小鼠的4细胞胚胎融合成2细胞的胚胎，再用1枚正常的2n胚胎与1枚4n胚胎聚合，形成2n/4n嵌合体，胚胎移植后产下3只小鼠，在这3只小鼠中均未检测到有4n细胞存在。

用ES细胞或内细胞团与早期4n胚胎嵌合形成2n/4n嵌合体胚胎，移植到假孕小鼠的子宫中进行妊娠，可以获得成活的动物。Nagy *et al.*（1990）用15～20个内细胞团（ICM）的细胞或ES细胞与1枚4细胞期的4n胚胎聚合形成2n/4n嵌合体胚胎。在出生的6只ICM/4n嵌合体小鼠中，经GPI型分析，只有1只小鼠的血液和尾尖可检测到4n来源的细胞，且比例少于5%，其余5只均未检测到有4n细胞存在；在14只ES/4n嵌合体小鼠中，只有3只小鼠的血液和尾尖可检测到4n来源的细胞，但比例都少于10%。Nagy *et al.*（1993）用具有青紫色的129/Sv雌鼠与野生型129/Sv-Cp雄鼠杂交，胚胎用于制作ES细胞，同时，用白化的CD1小鼠制成4n胚胎，把10～15个ES细胞团与2枚4细胞期的4n胚胎进行聚合，2枚4n胚胎像三明治一样夹住ES细胞，用玻璃针轻轻挤压胚胎，使相互靠近，将胚胎于微滴（microdrops）中培养过夜，再移植到假孕2.5 d的小鼠子宫中妊娠，在移植的130枚嵌合体胚胎中，共87枚胚胎着床，其中，45枚胚胎被吸收，22枚胚胎妊娠中期死亡，出生20只小鼠，只有5只存活。在5只存活的小鼠中，毛色均为野生色。血液GPI分析，其中只有1只能检测到4n来源的细胞（5%～10%），其余均来源于ES细胞。

3.3 2n/4n嵌合体4n细胞非随机性分布的可能机制

四倍体细胞在2n/4n嵌合体中，为什么会出现有倾向性的分布呢？对此，有人提出2种解释：①原始外胚层细胞对4n细胞的负选择（negative selection）以及4n细胞在原始内胚层和滋养外胚层的倾向性分布的结果（James *et al.*，1995）。②四倍体细胞在原始外胚层细胞和胎体（concepti）中的选择性死亡（selective death）的结果（James *et al.*，1995）。另外有人认为，由于4n细胞的体积一般比正常2n细胞的体积大，细胞体积大小和染色体数目的增加，以及细胞体积和表面积比的改变，导致这种细胞选择性地分布在囊胚期的壁滋养层细胞中（Lu & Markert，1980；Tang *et al.*，2000）。2n/4n嵌合体中的4n细胞的选择性分布机制，目前还不很清楚，有待进一步研究。

4 2n/4n嵌合体的应用

对4n细胞在2n/4n嵌合体中的非随机性分布的机理尽管我们目前还不很清楚，但我们可以利用这种现象来制作一种孕体（conceptus），使这种孕

体的滋养外胚层和原始内胚层的基因型与原始外胚层细胞系和胎儿本身的基因型完全不一样。因此，在制作某些基因缺陷动物、动物克隆和胚胎发育的基因调控研究上，2n/4n 嵌合体是一种极有价值的研究模型。

4.1 挽救某些基因缺陷胚胎

某些基因控制着胚胎的着床和胚胎外组织的发育，当这种基因发生突变时，胚胎不能着床或发生早期流产。用正常的 4n 胚胎与这些基因缺陷胚胎聚合，把这种聚合的嵌合体胚胎移植到假孕的母体子宫内进行妊娠，就能挽救这种基因缺陷胚胎，使之在体内能继续发育，甚至获得这类纯合的基因突变动物。

运用 2n/4n 嵌合体方法首次获得的基因缺陷小鼠是 Mash2 突变小鼠（$Mash2^{-/-}$）（Kupriyanov & Baribault，1998）。Mash2 基因的产物是具有螺旋－环－螺旋结构的转录因子，在胚胎外滋养层细胞中，如外胎盘锥、绒毛膜等中，Mash2 有较强的表达。经基因打靶方法得到的 $Mash2^{-/-}$ 胚胎的胎盘组织中缺乏海绵滋养层细胞（spongiotrophoblast）和它的前体，同时，绒毛外胚层细胞减少。突变胚胎由于胎盘发育受阻，通常在 10 d 时死亡（Guillemot & Joyner，1993）。Guillemot *et al*.（1994）用 $Mash2^{+/+}$ 野生型的 4n 胚胎与用 $Mash2^{+/-}$ 自交得到的胚胎（桑椹）进行嵌合，经移植后，共得到 66 只成活的新生小鼠，经过鉴定，有 10 只新生小鼠是 $Mash2^{-/-}$ 型。这一实验证明，Mash2 基因在胚胎外组织中的表达对胚胎的发育是必需的，而该基因在胎儿本身中是否表达却不影响胚胎的发育。$Mash2^{-/-}$ 胚胎的挽救成功，说明 2n/4n 嵌合体方法是挽救胎盘发育受阻的基因缺陷动物的一种有效的方法（Guillemot *et al*.，1994）。

Ets2 基因的产物也是 1 个转录因子，在小鼠胚胎 6.0～7.5 d 时，Ets2 主要在胚胎的滋养外胚层的衍生组织中表达，在胚外内胚层和原始外胚层中却没有表达。对 Ets2 基因的 DNA 结合区域进行缺失，$Ets2^{dbl/dbl}$ 缺失胚胎是早期致死，在 E6.0－7.5 d 时，有 1 个非正常的小外胎盘锥，外面包裹着 1 层膜，从而阻止了滋养层细胞的迁移。到 E7.5 d，绒毛膜和羊膜都没有形成，滋养层组织和外胎盘锥停止增生，原始内胚层开始凋亡。$Ets2^{dbl/dbl}$ 胚胎在 E8.5 d 时全部被母体吸收（Maroulakou *et al*.，1994；Yamamoto *et al*.，1998）。Yamamoto *et al*.（1998）用 2n/4n 嵌合体方法挽救 $Ets2^{dbl/dbl}$ 胚胎，在 40 只嵌合体新生小鼠中，用 PCR 方法检测到有 4 只是 $Ets2^{dbl/dbl}$ 基因型；而 $Ets2^{dbl/dbl}$ 小鼠是可育的，但腮须卷曲，体毛分布呈波浪状。

近年来，用 2n/4n 嵌合体方法挽救基因缺陷胚胎的实验报道越来越多（表 1），这些基因包括有转录因子如 Mash2、Estrrb、Hnf4、Ets2、Handl、Fra1，细胞骨架蛋白如 mK8，肿瘤抑制因子如 Brca1，生长因子如 VEGF 和激酶如 FAK 等。

4.2 动物克隆

用核移植方法克隆的动物，它们只是核型一致，但胞质类型却不一定相同，因此这些克隆动物不是完全的复制体。用 ES 细胞经 2n/4n 嵌合体方法获得的克隆动物则是完全的复制体。Nagy *et al*.（1990）分别用小鼠的 ICM 和 ES 细胞与四倍体的小鼠胚胎聚合，移植到假孕母鼠中，结果在移植的 21 枚 ICM↔四倍体嵌合体胚胎中，76% 的胚胎着床，获得 6 只由 ICM 细胞克隆的小鼠，成功率达 29%；用 ES 细胞与四倍体胚胎聚合时，移植了 101 枚胚胎，70% 的胚胎着床，共获得 15 只由 ES 细胞克隆的小鼠。1993 年，Nagy 等用 2n/4n 嵌合体方法，从 1 株 ES 细胞中克隆了 5 只小鼠；从毛色上判断，5 只成活的小鼠完全来源于 ES 细胞；用 GPI 分析，1 只小鼠的血液中可检测到少量的四倍体来源的细胞（Nagy *et al*.，1993）。最近，Hochedlinger 等报道，他们分别用小鼠 B 淋巴细胞核和 T 淋巴细胞核作为核供体，用核移植方法获得小鼠的克隆胚胎，用这种克隆胚胎建立 ES 细胞，将 ES 细胞注射到 4n 小鼠囊胚中，胚胎移植后，分别获得了免疫球蛋白基因和 T 细胞受体基因完全重排过的克隆小鼠（Hochedlinger & Jaenisch，2002）。

2n/4n 嵌合体方法克隆动物目前还只在小鼠中实现，在其他动物中，也有人尝试，但未成功（Iwasaki *et al*.，2000）。Iwasaki 等用日本黑牛与奶牛的杂交 2 细胞胚胎用电融合方法，融合成单细胞，制成四倍体胚胎，在体外培养到桑椹，桑椹胚用 0.5% 的 Pronase 消化，去掉透明带，将 2 枚去透明带的桑椹胚夹住 1 团 137 个细胞的类 ES 细胞团（来源于奶牛），放入微滴中聚合，形成 1 枚新的嵌合体胚胎，胚胎发育到囊胚后再移植到发情 7～8 d 的受体母牛子宫中妊娠；在 7 头受体牛中，共移植了 12 枚嵌合体囊胚，结果产下 6 头小牛，但只有 2 头小牛是嵌合体，另外 4 头检测不到来源于 ES 细

胞的细胞；这种结果可能是由于137个细胞的细胞团分裂速度过慢，或没有进行血清饥饿处理，另外一个原因也可能是由于牛胚胎在电融合时不充分，没有制成真正的四倍体胚胎，而实际上是1个二倍体胚胎或是1个二倍体和四倍体的镶嵌胚胎（Iwasaki *et al.*，2000）。

表1 用2n/4n嵌合体方法挽救基因缺陷胚胎实验
Table 1 Rescuing genetic deficient embryos by 2n/4n aggregation

突变基因 Gene symbol	基因功能 Function of gene product	基因作用时间 Stage of prenatal abnormalities (d)	致死原因 Abnormalities	文献 Reference
Mash2	TF	E8.5－10.5	不能建立绒毛尿囊循环	Guillemont *et al.*，1994
Hnf4	TF	E6.5－9.5	脏壁内胚层功能不全	Duncan *et al.*，1997
Estrrb	TF	E7.5－11	缺乏绒毛尿囊循环，胎盘功能受阻	Luo *et al.*，1997
Ets2	TF	E6.5－8.5	外胎盘锥发育畸型	Yamamoto *et al.*，1998
Hand1	TF	E7.5－9.5	滋养层巨大细胞缺陷	Riley *et al.*，1998
MK8	细胞骨架蛋白	E1.5－13.5	胎盘屏障功能失常	Kupriyanov & Baribault，1998
Brca1	肿瘤抑制因子	E5.5－7.5	滋养外胚层或胚外内胚层细胞缺陷	Hakem *et al.*，1996
VEGF	生长因子	E8.5－10.5	滋养外胚层或胚外内胚层细胞缺陷	Carmeliet *et al.*，1996
Thrombomodulin (TM)	表面受体	E8.5，E12.5－16.6	胎盘中无血管内皮细胞生成	Isermann *et al.*，2001
Dsp	细胞连接蛋白	E3.5－6.5	无桥粒连接，组织不完整	Gallicano *et al.*，2001
Fra1	转录因子	E10.0－10.5	胚胎外组织缺陷	Schreiber *et al.*，2000
DsXM	2个来源于母系的X染色体	早期胚胎	外胚盘柱缺陷	Goto & Takagi，1998

通过核移植方法克隆的动物，初生体重偏大，胎盘的发育也往往出现异常（Hill *et al.*，2000；Sousa *et al.*，2001；Humpherys *et al.*，2001；Eggan *et al.*，2001；Ono *et al.*，2001）。Eggan *et al.*（2001）比较了用核移植方法和2n/4n嵌合方法得到的ES克隆小鼠的体重和胎盘大小，发现用核移植方法得到的克隆个体和胎盘的重量都普遍地大于正常出生的小鼠，而用2n/4n嵌合体方法克隆的小鼠，其体重大小和胎盘重量与正常出生的小鼠无显著差异。因而，他们认为，核移植克隆的动物个体的体重偏重和胎盘的异常发育是核移植方法本身所造成的，与使用的供核细胞无关。应用四倍体与克隆胚胎进行嵌合，能否克服核移植动物的胎盘发育异常的现象，有待实验证实。

5 展望

用核移植方法克隆动物的效率只有1%～4%，大部分克隆胚胎在妊娠过程中死亡或流产，而且个体和胎盘有异常的发育，这暗示克隆动物的效率不高，可能是与克隆胚胎在体内发育时的胎盘发育不正常有一定的关系。如果把2n/4n嵌合技术用于动物克隆，也许能解决克隆动物的胎盘不正常发育的问题，从而提高动物克隆的效率。

异种妊娠是动物异种克隆的一项关键技术。运用2n/4n嵌合体的4n细胞在胚胎发育过程中的倾向性分布这一特性，我们可以构建一种异种2n/4n嵌合体，用与寄母是同一物种的胚胎制成四倍体胚胎，与要移植的另一个物种的二倍体胚胎嵌合，形成异种2n/4n嵌合体，这种嵌合体移植到寄母子宫中妊娠，由于与寄母是同一物种的四倍体细胞形成胎盘，因而这种孕体可较易与寄母建立联系。通过这种胚胎细胞系的置换方法，也许能够实现动物的异种妊娠。

参考文献：

Bradley A，Evans M，Kaufman M H，*et al*. 1984. Formation of germ-line chimaera from embryo-derived teratocarcinoma cell lines [J]. *Nature*，**309**：255－256.

Carmeliet P，Ferreira V，Breier G，*et al*. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele [J]. *Nature*，**380**：435－439.

Duncan S A，Nagy A，Chen W. 1997. Murine gastrulation requires HNF-4(−/−) embryos [J]. *Development*，**124**：279－287.

Eggan K, Akutsu H, Loring J, *et al*. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (11): 6209-6214.

Eglitis M A. 1980. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol [J]. *J. Exp. Zool.*, **213**: 309-313.

Everett C A, West J D. 1998. Evidence for selection against tetraploid cells in tetraploid↔diploid mouse chimaeras before the late blastocyst stage [J]. *Genet. Res.*, **72**: 225-228.

Everett C A, Stark M H, West J D, *et al*. 2000. Three-dimensional reconstruction of tetraploid↔diploid chimaeric mouse blastocysts [J]. *J. Anat.*, **196**: 341-346.

Gallicano G I, Bauer C, Fuchs E. 2001. Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature [J]. *Development*, **128** (6): 929-941.

Goto Y, Takagi N. 1998. Tetraploid embryos rescue embryonic lethality caused by an additional maternally inherited X chromosome in the mouse [J]. *Development*, **125** (17): 3353-3363.

Graham C F. 1971. Virus assisted fusion of embryonic cells [J]. *Acta Endocrinol.*, **153** (suppl.): 154-167.

Guillemot F, Joyner A L. 1993. Dynamic expression of the murine Achaete-scute homologue Mash-1 in the developing nervous system [J]. *Mech. Develop.*, **42**: 171-185.

Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, *et al*. 1994. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development [J]. *Nature*, **371**: 333-336.

Hakem R, Pompa J L de la, Sirard C, *et al*. 1996. The tumor suppressor gene Brca 1 is requires for embryonic cellular proliferation in the mouse [J]. *Cell*, **85**: 1009-1023.

Henery C C, Bard J B, Kaufman M H. 1992. Tetraploidy in mice, embryonic cell number, and the grain of the developmental map [J]. *Dev. Biol.*, **152** (2): 233-241.

Hill J R, Burghardt R C, Jones K, *et al* 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses [J]. *Biol. Reprod.*, **63** (6): 1787-1794.

Hochedlinger K, Jaenisch R. 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells [J]. *Nature*, **28**; **415** (6875): 1035-1038.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H. *et al*. 2001. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice [J]. *Science*, **293** (5527): 95-97.

Isermann B, Hendrickson S B, Hutley K, *et al*. 2001. Tissue-restricted expression of Thrombomodulin in the placenta rescues Thrombomodulin-deficient mice from early lethality and reveals a secondary development block [J]. *Development*, **128** (6): 827-838.

Iwasaki S, Campbell K H S, Galli C, *et al*. 2000. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos [J]. *Biol. Reprod.*, **62**: 470-475.

James R M, Klerkx A H E M, Keighren M, *et al*. 1995. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid↔diploid chimaeras [J]. *Dev. Biol.*, **167**: 213-226.

Kaufman M H, Webb S. 1990. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion [J]. *Development*, **110**: 1121-1132.

Kupriyanov S, Baribault H. 1998. Genetic control of extraembryonic cell lineages studies with tetraploid↔dilpoid chimeric concepti [J]. *Biochem. Cell Biol.*, **76**: 1017-1027.

Lu T Y, Markert C L. 1980. Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 6012-6016.

Luo J, Sladek R, Bader J A, *et al*. 1997. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta [J]. *Nature*, **388**: 778-782.

Maroulakou I G, Papas T S, Green J E. 1994. Differential expression of ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis [J]. *Oncogene*, **9**: 1551-1565.

Modlinski J A. 1978. Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts [J]. *Nature*, **273** (8): 466-467.

Nagy A, Gocza E, Diaz E M, *et al*. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in mouse [J]. *Development*, **110**: 815-821.

Nagy A, Rossant J, Nagy R, *et al*. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 8424-8428.

O'Neill G T, Speirs S, Kaufman M H. 1990. Sex chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos [J]. *Cytogenetics Cell Genetics*, **53**: 191-195.

Ono Y, Shimozawa N, Ito M, *et al*. 2001. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer [J]. *Biol. Reprod.*, **4** (1): 44-50.

Riley P, Anson-Cartwright L, Cross J C. 1998. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis [J]. *Nat. Genet.*, **18**: 271-275.

Schreiber M, Wang Z Q, Jochum W, *et al*. 2000. Placental vascularisation requires the AP-1 component Fra1 [J]. *Development*, **127**: 4937-4948.

Snow M H L. 1973. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage [J]. *Nature*, **244**: 513-515.

Snow M H L. 1975. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation [J]. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **34**: 707-721.

Snow M H L. 1976. The immediate postimplantation development of tetraploid mouse blastocysts [J]. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **35**: 81-86.

Sousa P A de, King T, Harkness L, *et al*. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae [J]. *Biol. Reprod.*, **65**: 23-30.

Tang P C, Ritchie W A, Wilmut I, *et al*. 2000. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts [J]. *Zygote*, **8** (1): 33-43.

Tarkowski A K, Witkowska A, Opas J. 1977. Development of cytochalasin B-induced tetrploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos [J]. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **41**: 47-64.

Yamamoto H, Flannery M L, Kupriyanov S, *et al*. 1998. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of ets2 [J]. *Genes Dev.*, **12**: 1315-1326.